Aus der Abteilung für Exp. Endokrinologie am Institut
für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des
Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Professor Dr.med.,Dr.phil.,Dipl.-chem.W.Zimmermann

FREIE UND KONJUGIERTE STEROIDE IN PLASMA, GALLE UND HARN DES MEERSCHWEINCHENS NACH GABE VON ^{3}H-MARKIERTEN DHEA, DHEA-SULFAT UND DHEA-SULFATID

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jürgen Neiser

1966

Dekan: Professor Dr.rer.nat. H.Muth

Referent: Professor Dr.rer.nat. G.W.Oertel

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 27. Mai 1968 abgelegt.

FREIE UND KONJUGIERTE STEROIDE IN PLASMA , GALLE UND HARN DES MEERSCHWEINCHENS NACH GABE VON ^{3}H-MARKIERTEM DHEA , DHEA-SULFAT UND DHEA-SULFATID [1]

Von

Neisser, J., Rindt, W., Knapstein, P. u. G.W. Oertel

Abteilung für Exp. Endokrinologie, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität des Saarlandes, 665 Homburg/Saar DEUTSCHLAND

Received on November 18th, 1965

Following the injection of ^{3}H-labeled free DHEA, DHEA-sulfate and DHEA-sulfatide bile, urine, and plasma of male guinea pigs were assayed at various times for free and conjugated C_{19}-steroids. While free DHEA was rapidly converted into conjugated metabolites, excreted primarily in bile, a major portion of administered DHEA-sulfate appeared in bile unchanged. At the same time, a relatively higher percentage of radioactivity could be detected in urine. In contrast to an immediate excretion of metabolites in bile after injection of free DHEA or DHEA-sulfate, the excretion of labeled C_{19}-steroid conjugates originationg from DHEA-sulfatide was found to be delayed, thus agreeing with a longer half-life of such conjugates on behalf of their lipophile properties. A qualitatively and quantitatively different composition of the conjugate fractions, from which 7 C_{19}-steroids could be isolated and partly identified clearly points to a different metabolism of free and sulfoconjugated DHEA.

Im Verlaufe von in-situ Perfusions-versuchen an der Meerschweinchenleber mit freiem 3ß-Hydroxy-androst-5-en-17-on (Dehydroepiandrosteron, DHEA), DHEA-sulfat oder DHEA-sulfatid liess sich trotz Aufarbeitung verschiedenen Gewebes nur ein Teil der injizierten

Radioaktivität erfassen. Angesichts der ausgedehnten Untersuchungen von DICZFALUSY et al. [2,3] und ADLERCREUTZ et al. [4,5] über einen entero-hepatischen Kreislauf von C_{18}-Steroiden lag die Annahme nahe, dass auch im vorliegenden Falle ein beträchtlicher Teil der verabreichten Verbindungen in der Galle ausgeschieden wird.

Zwecks Überprüfung dieser Hypothese, wie auch einer Aufklärung der möglicherweise unterschiedlichen Stoffwechselvorgänge hinsichtlich Abbau bzw. Konjugation vorgenannter Verbindungen wurden daher folgende Experimente durchgeführt. Nach i.v. Injektion ^{3}H-markierten DHEA's, DHEA-sulfats oder DHEA-sulfatids sammelte man Galle, Harn und Plasma der Meerschweinchen in gewissen Zeitabständen und analysierte ihren Gehalt an freien und konjugierten C_{19}-Steroiden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Materialgewinnung

7α-^{3}H-DHEA wurde von The Radiochemical Centre, Amersham, ENGLAND (Spez.Aktivität: 18 300 mC/mM) bezogen. 7α-^{3}H-DHEA-sulfat wurde hieraus nach ROY [6] hergestellt, während man 7α-^{3}H-DHEA-sulfatid durch Bebrütung von Meerschweinchenleber mit 7α-^{3}H-DHEA-sulfat [7] gewann. Alle benutzten Verbindungen entsprachen den üblichen Reinheitsanforderungen.

An erbreinen, männlichen Meerschweinchen vom Stamme "Pirbright white" (F. Winkelmann, Kirchborchen üb. Paderborn, DEUTSCHLAND) führte man sodann nachstehende Untersuchungen durch : Nach Einbinden eines Katheters in den Choledochus unter Nembutal-Narkose (2.5 mg/100 g Körpergewicht) wurden den Tieren obige Verbindungen in der aus Tab.1 ersichtlichen Konzentration i.v. appliziert. Anschliessend sammelte man die gesamte abfliessende Galle in 10-Minuten-Portionen, entnahm zu verschiedenen Zeitpunkten je 1 ml Blut aus der Vena jugularis und gewann den gesamten Harn am Ende des 70 Minuten dauernden Versuches durch Punktion der Blase.

Aufarbeitung

Plasma, Galle und Harn aus den Versuchen 1 - 3 (1 = freies DHEA, 2 = DHEA-sulfat, 3 = DHEA-sulfatid) wurden in gleicher Weise aufgearbeitet :

a) Freie Steroide
Die freien Steroide wurden durch erschöpfende Extraktion mit

Chloroform entfernt. Nach Waschen mit 0.1 n Natronlauge und Wasser, Trocknen und Eindampfen des Extraktes chromatographierte man den Rückstand auf Aluminiumoxyd-G in Cyclohexan-Butylacetat-Butanol (5:4.5:0.5 v/v) und legte die radioaktiven Zonen im Dünnschichtscanner LB-2720 (Labor Prof.Dr. Berthold, Wildbad, DEUTSCHLAND) fest. Da die vorhandene Radioaktivität für eine ausreichende Identifizierung der einzelnen Verbindungen zu gering war, erfolgte die quantitative Messung nur in toto.

b) Steroid-konjugate :
Nach Extraktion der freien Steroide versetzte man das restliche Material mit 6 Vol Äthanol-Aceton (1:1 v/v), saugte nach 30 Minuten bei 37°C vom Präzipitat ab und engte das Filtrat im Rotovac bei max. 40°C bis auf 2.5 ml ein. Anschliessend wurde die Lösung mit 20 ml Äthanol-Aceton (1:4 v/v) versetzt, 30 Minuten bei -15°C aufbewahrt, filtriert und zur Trockne eingedampft. Den in Äthanol-Aceton (1:6 v/v) löslichen Anteil überführte man sodann auf Kieselgel-G und chromatographierte im Lösungsmittelsystem Heptan-Äther (1:1 v/v), um evtl. vorhandene Steroid-sulfatide von -sulfaten und -glucuronosiden abzutrennen. Letztere Fraktionen, die am Auftragungsort zurückblieben wurden einer zweiten Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G in Chloroform-Methanol-Ammoniak (15:5:0.2 v/v) unterworfen. Steroid-sulfate (R_f = 0.2 - 0.3) und -glucuronoside (R_f = 0.0) wurden eluiert und ebenso wie die Steroid-sulfatide durch Solvolyse in Äthylacetat-Schwefelsäure [8] bzw. Inkubation mit β-Glucuronidase zerlegt. Die Reinigung der freigesetzten Steroide geschah in üblicher Weise.

c) Versuche zur Identifizierung einzelner C_{19}-Steroide :
Zur Auftrennung der einzelnen Fraktionen in die verschiedenen, darin enthaltenen C_{19}-Steroide standen folgende chromatographische Systeme zur Verfügung :

1. Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxyd Woelm (neutral, Woelm, Eschwege, DEUTSCHLAND) in Cyclohexan-Butylacetat-Butanol (5:4.5:0.5 v/v)
2. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G (Merck AG, Darmstadt, DEUTSCHLAND) in Äthylacetat-Cyclohexan (2:8 v/v)[9]
3. Papierchromatographie auf MN-Papier 214 FF (Macherey u. Nagel, Düren, DEUTSCHLAND) in Propylenglykol/Methylcyclohexan [10]
4. Papierchromatographie auf MN-Papier 214 FF in Propylenglykol/Toluol [11]

Die verschiedenen Fraktionen bzw. Einzelverbindungen wurden zusammen mit entsprechenden Standardverbindungen in wenigstens 3 der angegebenen Systeme chromatographiert.

d) Qualitative und quantitative Erfassung markierter Steroide :
Während die qualitative Festlegung markierter Verbindungen im Dünnschichtscanner LB-2720 erfolgte, wurde jegliche quantitative Bestimmung im Packard Tricarb Spektrometer 314 EX unter Verwendung von 0.4% 2,5-Diphenyloxazol (POP) und 0.04% 1,4-Bis[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP, Packard Instr.Comp., La Grange, Ill., USA) durchgeführt, wobei Äthanol-Toluol (1:7 v/v) als Lösungsmittel diente.

ERGEBNISSE

Nach Injektion von ^{3}H-markiertem DHEA (= 1), DHEA-sulfat (= 2) und biosynthetischem DHEA-sulfatid (= 3) fand man die in Tab.1 angegebene Gesamtradioaktivität, wie sie aus Plasma, Galle und Harn gewonnen werden konnte.

TABELLE 1

Ausscheidung von Radioaktivität in Galle und Harn des Meerschweinchens nach Gabe von markiertem DHEA, DHEA-sulfat und DHEA-sulfatid

Versuch	injiziert : Verbindung	µg	I/min	ausgeschieden : %	RA_G/RA_H
1	7α-^{3}H-DHEA	0.182	4 300 000	44.28	24.7
2	7α-^{3}H-DHEA-SO_4	0.089	1 566 000	46.66	3.0
3	7α-^{3}H-DHEA-sulfatid	0.005	36 420	20.46	7.3

RA_G = Radioaktivität in Galle

RA_H = Radioaktivität in Harn

Die Ausscheidung von markierten Steroiden in den jeweiligen 10-Minuten-Portionen der gesammelten Galle lässt sich aus Abb.1 entnehmen.

In Tab.2 ist die in den verschiedenen Fraktionen nachweisbare Radioaktivität aufgeführt, sowie das Verhältnis von Steroid-sulfaten zu Steroid-glucuronosiden. Zwecks besseren Vergleiches wurden die Plasmawerte in Tab.2 stets auf 1 ml bezogen, sodass auch eine ungefähre Abschätzung der Konzentration markierter Steroide im gesamten Blutkreislauf (20 - 25 ml Blut bei 300 g Körpergewicht) möglich erscheint.

TABELLE 2

Ausbeute an Radioaktivität in einzelnen Fraktionen nach i.v.Gabe von DHEA, DHEA-sulfat und DHEA-sulfatid

Versuch	Material	ml	Ausbeute in % injizierter Radioaktivität					
			Freie Steroide	Steroid-sulfatide	Hydroph. Konjugate	Steroid-sulfate	Steroid-glucur.	
			1	2	3	4	5	4/5
1	Plasma	1						
	30'		0.124	0.073	0.152	0.104	0.038	2.8
	45'		0.063	0.166	0.098	0.049	0.037	1.3
	Galle	9.0	-	-	42.56	28.91	8.09	3.6
	Harn	1.8	2.89	-	1.72	1.10	0.72	1.5
2	Plasma	1						
	15'		0.017	0.017	0.225	0.190	-	100
	30'		0.027	0.018	0.109	0.034	-	100
	Galle	8.2	1.08	-	34.87	18.67	0.142	100
	Harn	3.5	1.12	-	11.79	8.25	-	100
3	Plasma	1						
	15'		0.017	0.051	0.311	0.208	-	100
	30'		0.303	0.042	0.178	0.115	-	100
	70'		0.123	0.019	0.131	0.070	-	100
	Galle	6.4	2.29	-	18.01	12.81	0.520	13.2
	Harn	2.4	0.137	-	2.45	1.16	0.085	13.6

Bei der Auftrennung freier bzw. freigesetzter C_{19}-Steroide in Einzelverbindungen bediente man sich der in Tab.3 zusammengefassten chromatographischen Systeme, die im Falle einer wiederholten Anwendung eine gewisse Identifizierung einzelner Substanzen gestatten.

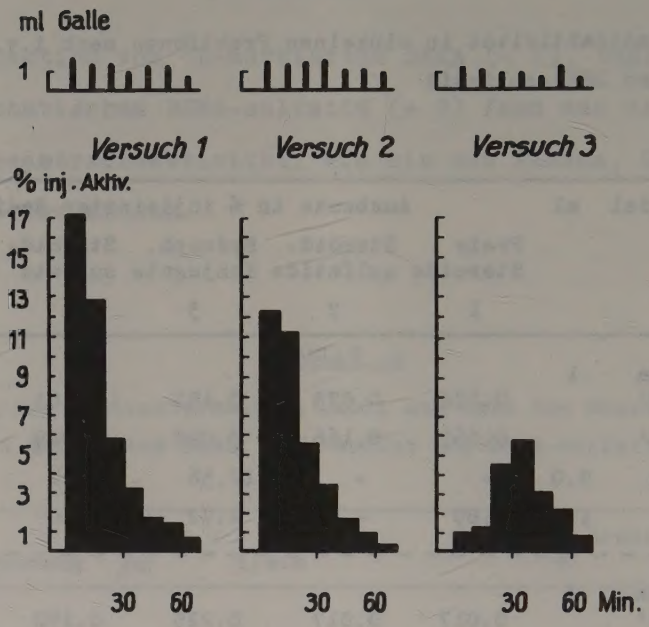

ABBILDUNG 1

Ausscheidung markierter Steroide in der Galle nach Verabreichung von ^{3}H-markiertem DHEA, DHEA-sulfat oder DHEA-sulfatid

Aufgrund der chromatographischen Eigenschaften wurde angenommen, dass Substanz A mit 3ß,16α-Dihydroxy-androst-5-en-17-on (16α-Hydroxy-dehydropeiandrosteron), B mit Androst-5-en-3ß,17ß-diol (Androstendiol), E mit 3ß-Hydroxy-androst-5-en-17-on (Dehydroepiandrosteron, DHEA), F mit 3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on (Ätiocholanolon) und G mit 3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on (Androsteron) identisch ist.

TABELLE 3

Wanderungsgeschwindigkeit isolierter C_{19}-Steroide und entsprechender Testsubstanzen in verschiedenen chromatographischen Systemen

Verbindung	R_f-bzw. R_T-Wert in System :			
	1	2	3+	4
A	0.05	0.08	0.01	0.17
B	0.11	0.30	0.35	0.28
C	0.12		0.94	
D	0.14		1.36	
E	0.34	0.73	1.87	
F	0.33	0.72	2.25	
G	0.38	0.74	3.10	
3β,16α-Dihydroxy-androst-5-en-17-on	0.05	0.07	0.01	0.15
Androst-5-en-3β,17β-diol	0.13	0.33	0.34	0.29
17β-Hydroxy-androst-4-en-3-on	0.14		1.00	
3β-Hydroxy-androst-5-en-17-on	0.35	0.74	1.85	
3α-Hydroxy-5β-androstan-17-on	0.32	0.72	2.20	
3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on	0.38	0.76	3.20	

1 = Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxyd in Cyclohexan-Butylacetat-Butanol (5:4.5:0.5 v/v)

2 = Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G in Cyclohexan-Äthylacetat (8:2 v/v)

3 = Papierchromatographie auf MN 214 FF in Propylenglykol/Methylcyclohexan

4 = Papierchromatographie auf MN 214 FF in Propylenglykol/Toluol

+ = R_T-Wert (Wanderungsgeschwindigkeit bezogen auf Testosteron)

Die aus den verschiedenen Fraktionen isolierten C_{19}-Steroide konnten in den aus Abb.2 und 3 ersichtlichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Da die im dritten Versuch zur Verfügung stehende

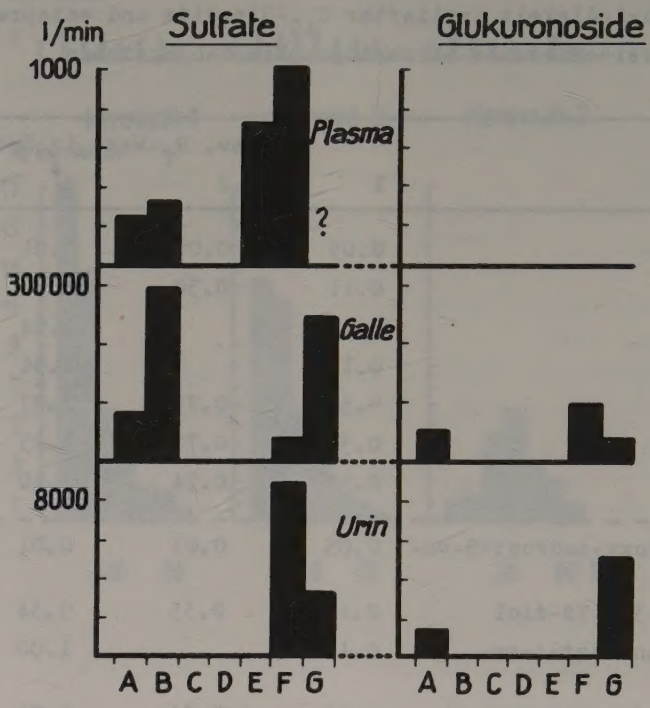

ABBILDUNG 2

Zusammensetzung der C_{19}-Steroid-sulfate und -glucuronoside in Plasma, Galle und Harn nach i.v. Injektion von freiem DHEA

Anfangsaktivität des biosynthetischen DHEA-sulfatids nur gering war, musste auf eine Isolierung und jegliche Versuche zur Identifizierung verzichtet werden.

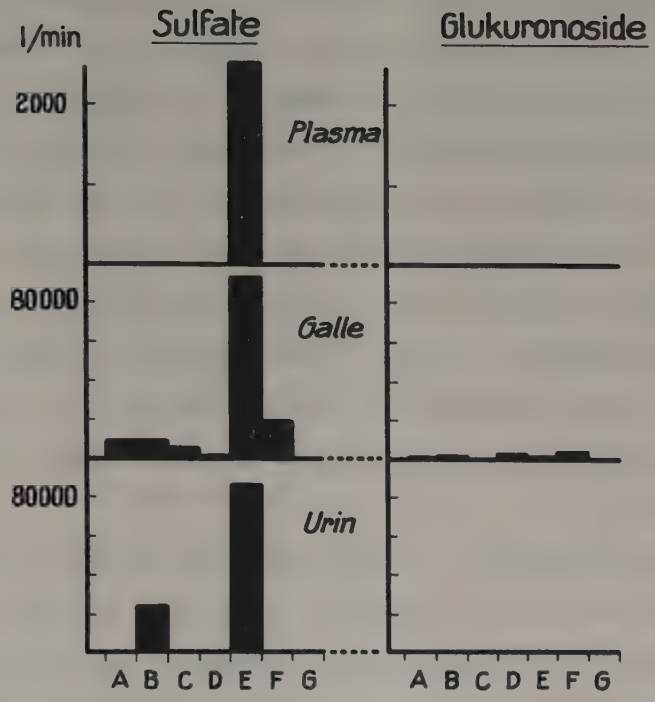

ABBILDUNG 3

Zusammensetzung der C_{19}-Steroid-sulfate und -glucuronoside in Plasma, Galle und Harn nach i.v. Injektion von DHEA-sulfat

DISKUSSION

Wie die Tab.1 veranschaulicht, war die Ausbeute an markierten Steroiden aus Plasma, Galle und Harn nach Verabreichung von freiem DHEA (= 1) und DHEA-sulfat (= 2) mit 44.28% bzw. 46.66% allein in

Galle und Harn beträchtlich höher als nach Gabe von biosynthetischem DHEA-sulfatid (20.46%). Diese Befunde sprechen für einen verzögerten oder aber andersartigen Metabolismus letzterer Verbindung ; wohl aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften, die sicherlich auch eine verlängerte Halbwertszeit bewirken [12]. Abb. 2 mag in diesem Sinne als Bestätigung einer solchen Annahme angesehen werden, da die Ausscheidung radioaktiver Steroide in der Galle nach Verabreichung des biosynthetischen DHEA-sulfatids ein Maximum erst innerhalb von 30 - 40 Minuten erreichte, während im ersten und zweiten Versuch, d.h. nach Injektion von freiem DHEA oder DHEA-sulfat eine mengenmässig bedeutsame Exkretion unmittelbar erfolgte.

Die im Plasma vorhandenen, markierten freie Steroide bei Versuch 2 und 3 deuten auf eine allmähliche Hydrolyse der Sulfo-konjugate. Aus freiem DHEA und DHEA-sulfat wiederum bildete sich das lipophile DHEA-sulfatid in Übereinstimmung mit früheren in-vivo und in-vitro Versuchen [13,14] . Die geringen Aktivitäten besagter Fraktionen und die Möglichkeit einer partiellen Zersetzung des labilen DHEA-sulfatids im Verlauf der chromatographischen Schritte beeinträchtigen allerdings hier eine quantitative Auswertung des herrschenden Gleichgewichtes zwischen DHEA, DHEA-sulfat und DHEA-sulfatid. Glucuronoside konnten im Plasma nur nach Injektion von freiem DHEA nachgewisen werden.

Betrachtet man die Zusammensetzung der in Galle ausgeschiedenen Anteile applizierter Radioaktivität, so fällt sogleich die Abwesenheit von freiem Steroid oder Steroid-sulfatid auf. Das Verhältnis von Steroid-sulfaten zu Steroid-glucuronosiden belief sich im ersten Versuch auf 3.6, im zweiten auf >100 und im dritten auf 13.2. Offenbar wird DHEA-sulfat bevorzugt unverändert in der Galle ausgeschieden, was auch in Abb. 4 zu erkennen ist. Erfordert

doch die Bildung von Glucuronosiden zunächst eine Hydrolyse der Schwefelsäure-ester-bindung, die bei Sulfatiden anscheinend leichter vonstatten geht.

In diesem Zusammenhange ist es weiter nicht verwunderlich, dass im Harn nach Verabreichung von DHEA-sulfat innerhalb von 70 Minuten kein markiertes Steroid-glucuronosid in messbarer Konzentration auftrat, im Gegensatz zu dem ersten und dritten Versuch. Hinsichtlich der Zusammensetzung einzelner Fraktionen aus verschiedenen C_{19}-Steroiden ergaben sich für die beiden ersten Versuche deutliche Unterschiede, sowohl qualitativer wie auch quantitativer Art (Abb. 2 und 3). So fand man die Verbindungen C und D nur nach Gabe von DHEA-sulfat. Letztere Verbindung stellte hier den weitaus grössten Teil sämtlicher Steroid-sulfate, wogegen im Anschluss an die Injektion von freiem DHEA die reduzierten Metaboliten Atiocholanolon und Androsteron überwogen. Die Identifizierung der Einzelverbindungen beschränkte sich auf den Vergleich ihrer chromatographischen Eigenschaften mit denjenigen authentischer Standardsubstanzen. Eine eindeutige Aussage würde die Überprüfung ihrer spezifischen Aktivität im Zuge wiederholter Reinigungsschritte nach umgekehrter Isotopenverdünnung erfordern, was lediglich im Falle des DHEA's, Ätiocholanolons und Androsterons geschah. Die angenommenen Metaboliten des DHEA's sind als solche bereits hinlänglich bekannt [15,16]. Untersuchungsergebnisse von KLEMPIEN et al.[17], SCHNEIDER u. MASON [18] und COLAS [19] lassen auf eine Bildung dieser Stoffwechselprodukte in der Leber schliessen. In jedem Falle aber scheint eir unterschiedlicher Metabolismus von freiem DHEA und DHEA-sulfat zu bestehen, während die Frage nach dem Stoffwechsel von DHEA-sulfatid noch offen bleibt. Schliesslich passen vorstehende Beobachtungen, dass ein wesentlicher Teil injizierten DHEA's bzw. DHEA-sulfats oder DHEA-sulfa-

tids mehr oder weniger rasch in der Galle ausgeschieden wird, zu ähnlichen Befunden anderer Autoren [1-4,20-23], die sich allerdings vornehmlich auf Experimente mit Oestrogenen oder Gestagenen beziehen. In der Reihe der C_{19}-Steroide setzen sich die in der Galle ausgeschiedenen Metaboliten praktisch nur aus Steroid-sulfaten und Steroid-glucuronosiden zusammen, was gleichfalls anderweitigen Feststellungen [4,5,24] entgegenkommt.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Injektion von ^{3}H-markiertem DHEA, DHEA-sulfat oder DHEA-sulfatid wurden Plasma, Galle und Harn männlicher Meerschweinchen zu verschiedenen Zeitpunkten auf freie und konjugierte C_{19}-Steroide untersucht. Während freies DHEA schnell in konjugierte Metaboliten umgewandelt wurde, erschien ein grösserer Anteil verabreichten DHEA-sulfats unverändert in der Galle. Zur gleichen Zeit konnte ein verhältnismässig grösserer Prozentsatz Radioaktivität im Harn nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einer unmittelbaren Ausscheidung von Metaboliten in der Galle nach Gabe von freiem DHEA oder DHEA-sulfat, fand man eine verzögerte Ausscheidung markierter Stoffwechselprodukte von biosynthetischem DHEA-sulfatid, was mit einer längeren Halbwertszeit solcher Konjugate aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften in Einklang steht. Die qualitativ und quantitativ verschiedene Zusammensetzung der Konjugatfraktionen in Plasma, Galle und Harn, aus denen 7 C_{19}-Steroide isoliert und teilweise identifiziert werden konnten, deutet auf einen unterschiedlichen Metabolismus freien und sulfokonjugierten DHEA's.

1 Vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, durchgeführt

2 Diczfalusy E., Franksson C. & Martinsen B., Acta endocr.(Kbh.), 38, 59 (1960)

3 Diczfalusy E., Franksson C., Lisboa B.P. & Martinsen B., Acta endocr.(Kbh.), 40, 537 (1962)

4 Adlercreutz H., Diczfalusy E. & Engstrom L., Endocrinology, 66, 80 (1960)

5 Adlercreutz H., Acta endocr.(Kbh.), Suppl. 72 (1962)

6 Roy A.B., Biochem.J., 62, 41 (1956)

7 Oertel G.W. & Groot K., Biochem.Z., 341, 1 (1965)

3 Burstein S. & Lieberman S., J.biol.Chem., 233, 331 (1958)

9 Neher R., Steroid Chromatography, Elsevier Publ.Comp., Amsterdam-London-New York, 1964, Ref.546.

10 Savard K., J.biol.Chem., 202, 457 (1953)

11 Zaffaroni A., Rec.Progr.Hormone Res., 8, 51 (1953)

12 Weinand K., Rindt W. & Oertel G.W., Acta endocr.(Kbh.), im Druck 1965

13 Oertel G.W. & Groot K., Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem., 341, 204 (1965)

14 Oertel G.W., Biochem.Z., 339, 125 (1963)

15 Mason H.L. & Kepler E.J., J.biol.Chem., 160, 255 (1945)

16 Mason H.L. & Kepler E.J., J.biol.Chem., 161, 235 (1945)

17 Klempien E.J., Voigt K.D. & Tamm J., Acta endocr.(Kbh.), 36, 498 (1961)

18 Schneider J.J. & Mason H.L., J.biol.Chem., 172, 771 (1948)

19 Colas A., Biochem.J., 82, 390 (1962)

20 Pearlman W.H., Fed.Proc., 7, 178 (1948)

21 Pearlman W.H., Rakoff A.E., Cantarow A. & Paschkis K.E., J. biol.Chem., 170, 173 (1947)

22 Sandberg A.A. & Slaunwhite W.R., J.clin.Invest., 36, 1266 (1957)

23 Bocklage B.C., Nicholas H.J., Doisy E.A., Elliott W.H., Thayer S.H. & Doisy E.A., J.biol.Chem., 202, 27 (1953)

24 Twombly G.H. & Levitz M., Amer.J.Obstetr.Gynec., 80, 889 (1960)